

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) **公開特許公報 (A)**

(11)特許出願公開番号

**特開平10-99098**

(43)公開日 平成10年(1998)4月21日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 Q 1/54

識別記号

F I

C 12 Q 1/54

審査請求 未請求 請求項の数3 O.L (全7頁)

(21)出願番号 特願平8-257111

(22)出願日 平成8年(1996)9月27日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年3月13日  
社団法人日本化学会発行の「日本化学会第70春季年会  
1996年講演予稿集▲II▼」に発表

(71)出願人 591024270

フジ製糖株式会社

静岡県清水市清開1丁目4番10号

(71)出願人 590002389

静岡県

静岡県静岡市追手町9番6号

(72)発明者 太田 俊也

静岡県駿東郡長泉町竹原344-6 ベルシ  
ヤインA502号

(72)発明者 大石 一男

静岡県沼津市三園町7-1 職住303

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 トレハロース分析用試薬

(57)【要約】

【解決手段】 ムタロターゼ2~40単位/ml、グルコースオキシダーゼ100~500 単位/mlおよびカタラーゼ200~5000単位/mlを少なくとも含有するグルコース消去前処理試薬と、トレハロースホスホリラーゼ 0.055~0.11単位/ml、アジ化ナトリウム 0.1~0.5 重量%、ペルオキシダーゼ10~100 単位/ml、4-アミノアンチピリン 0.5~5 mMおよび水素供与体 0.5~5 mMを少なくとも含有する生成グルコース検出試薬との組み合わせからなる、トレハロース分析用試薬。

【効果】 被検液中に存在する、測定ブランクを大きくし、トレハロースの酵素的測定の妨げとなるグルコースによる影響を消去でき、ブランク測定を行うことなく、簡便にかつ正確にトレハロースの測定を行うことができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ムタロターゼ2~40単位/ml、グルコースオキシダーゼ100~500 単位/mlおよびカタラーゼ200~5000単位/mlを少なくとも含有するグルコース消去前処理試薬と、トレハロースホスホリラーゼ0.055~0.11単位/ml、アジ化ナトリウム0.1~0.5 重量%、ペルオキシダーゼ10~100 単位/ml、4-アミノアンチピリン0.5~5 mMおよび水素供与体0.5~5 mMを少なくとも含有する生成グルコース検出試薬との組み合わせからなる、トレハロース分析用試薬。

【請求項2】 グルコース消去前処理試薬が、さらにリン酸緩衝液およびウシ血清アルブミンを含有することを特徴とする、請求項1記載のトレハロース分析用試薬。

【請求項3】 生成グルコース検出試薬が、さらにリン酸緩衝液、エチレンジアミン四酢酸、界面活性剤およびウシ血清アルブミンを含有することを特徴とする、請求項1記載のトレハロース分析用試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検液中のトレハロースを酵素的に定量する反応系において、該被検液中に原始的に含まれるグルコースの定量を別個行うことなく、簡便にかつ正確に測定を行うことのできるトレハロース分析用試薬に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、トレハロースの定量方法については幾つかの方法が知られている。その一つは、アンスロン法等で全糖量を測定するとともに、グルコース等の還元糖の量をネルソン法などで測定し、その還元糖の量を全糖量から差引くことで非還元糖たるトレハロースの測定を行う方法である。しかし、非還元糖はトレハロース以外にもあり（例えば、シュークロース）、全糖量から還元糖量を差し引いても正確なトレハロースの定量はできない。また、測定工程が非常に繁雑であり、時間と労力を要するばかりでなく、誤差も生じやすい。

【0003】他の方法として、高速液体クロマトグラフィーによる定量方法が挙げられるが、1検体の測定に長時間を要し、多数の検体を短時間で測定するのには適さないといった欠点、さらにはトレハロースを含んだ未知の検体を測定する際に、トレハロースと同じ保持時間を有する物質が含まれていた場合には、正しい測定値が得られないといった欠点がある。また別の方法として、トレハラーゼを用いた酵素的定量方法が知られている。この方法は、トレハロースをトレハラーゼで処理することにより2分子のグルコースに分解し、生成したグルコースを定量するといった原理に基づくものである。しかし、被検体中にトレハロースの他にグルコースが当初から含まれている場合には、そのグルコースの量だけを別に測定しておき、その分を全グルコース量から差引く必要があり、工程が繁雑であるとともに誤差要因も多いと

2

いう欠点がある。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、被検液中のトレハロースを酵素的に定量するための試薬において、該被検液中に原始的に含まれるグルコースの定量を別個行うことなく、簡便かつ正確に複数の検体の同時定量が可能なトレハロースの分析用試薬を提供することである。

## 【0005】

10 【課題を解決するための手段】上記課題に鑑み鋭意研究の結果、本発明者らは、被検液中に存在するグルコースを前もって消去し得る試薬と、トレハロースを分解するとともに生成したグルコースを定量し得る試薬とを組み合わせて用いれば、1検体につき2回以上の測定を行う必要がなく、簡便かつ正確にトレハロースの測定を行うことができるを見出し、本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、ムタロターゼ2~40単位/ml、グルコースオキシダーゼ100~500 単位/mlおよびカタラーゼ2000~5000単位/mlを少なくとも含有するグルコース消去前処理試薬と、トレハロースホスホリラーゼ0.055~0.11単位/ml、アジ化ナトリウム0.1~0.5 重量%、ペルオキシダーゼ10~100 単位/ml、4-アミノアンチピリン0.5~5 mMおよび水素供与体0.5~5 mMを少なくとも含有する生成グルコース検出試薬との組み合わせからなる、トレハロース分析用試薬である。

【0007】また、本発明は、グルコース消去前処理試薬が、さらにリン酸緩衝液およびウシ血清アルブミンを含有することを特徴とする上記トレハロース分析用試薬である。さらに、本発明は、生成グルコース検出試薬が、さらにリン酸緩衝液、エチレンジアミン四酢酸、界面活性剤およびウシ血清アルブミンを含有することを特徴とする上記トレハロース分析用試薬である。

## 【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のトレハロース分析用試薬は、グルコース消去前処理試薬(I)と、生成グルコース検出試薬(II)との組み合わせからなる。グルコース消去前処理試薬(I)は、少なくともムタロターゼ、グルコースオキシダーゼおよびカタラーゼを含有するが、溶媒としてリン酸緩衝液等を使用することができる。また、これ以外にも、酵素の安定化のためにウシ血清アルブミン、酵素の賦活化のために界面活性剤などを含有してもよい。溶媒としてリン酸緩衝液を使用するのが好ましく、またウシ血清アルブミンを含有するのが好ましい。

【0009】このグルコース消去前処理試薬(I)におけるムタロターゼの含有量は2~40単位/mlであり、グルコースオキシダーゼの含有量は100~500 単位/mlであり、カタラーゼの含有量は2000~5000単位/mlである。ムタロターゼの含有量を2~40単位/ml、グルコースオキシダーゼの含有量を100~500 単位/mlとすることに

3

より、被検液中に原始的に存在するグルコース ( $\alpha$ -D-グルコース,  $\beta$ -D-グルコース) を確実に消去することができる。また、カタラーゼの含有量を2000~5000単位/mlとすることにより、トレハロースの酵素的定量反応に影響を与える過酸化水素を確実に分解することができる。

【0010】生成グルコース検出試薬(II)は、少なくともトレハロースホスホリラーゼ、アジ化ナトリウム、ペルオキシダーゼ、4-アミノアンチビリンおよび水素供与体を含有する。この生成グルコース検出試薬(II)は、溶媒としてリン酸緩衝液等を含有することができ、そのリン酸は、トレハロースホスホリラーゼによるトレハロースとの反応に供与することができる。また、リン酸緩衝液以外にも、トレハロースホスホリラーゼの安定化のためにエチレンジアミン四酢酸；酵素、特にトレハロースホスホリラーゼの賦活化のために界面活性剤；酵素の安定化のためにウシ血清アルブミン；及び検体の濁りを軽減するために界面活性剤、例えばニッコーケミカル社製のOP10、ニッコーケミカル社製のBT7などを含んでいてもよい。溶媒としてリン酸緩衝液を使用するのが好ましく、またエチレンジアミン四酢酸、界面活性剤およびウシ血清アルブミンを含有するのが好ましい。

【0011】水素供与体としては、フェノール、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-アニシジン (ADOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン (TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル) アニリン (ALOS) や、それらの誘導体、例えばN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリンなどが挙げられ、各々単独でまたは適宜組み合わせて使用することができる。

【0012】この生成グルコース検出試薬(II)におけるトレハロースホスホリラーゼの含有量は 0.055~0.11単位/mlであり、アジ化ナトリウムの含有量は 0.1~0.5 重量%であり、ペルオキシダーゼの含有量は10~100 単位/mlであり、4-アミノアンチビリンの含有量は 0.5~5 mMであり、水素供与体の含有量は 0.5~5 mMである。トレハロースホスホリラーゼの含有量を 0.055~0.11単位/mlとすることにより、検体中のトレハロースを確実に  $\alpha$ -D-グルコースに変換することができ、アジ化ナトリウムの含有量を 0.1~0.5 重量%とすることにより、グルコース消去前処理試薬(I)で使用したカタラーゼの酵素活性を十分に阻害することができる。また、ペルオキシダーゼの含有量を10~100 単位/ml、4-アミノアンチビリンの含有量を 0.5~5 mM、水素供与体の含有量を 0.5~5 mMとすることにより、発色反応によって  $\beta$ -D-グルコース、ひいてはトレハロースを正確に定量することができる。

【0013】本発明のトレハロース分析用試薬を使用し

4

た場合、図1に示すように反応が進行する。なお、本発明において測定対象となり得るトレハロース含有検体(被検液)としては、トレハロース生産能を有する微生物のスクリーニングのための反応液や、微生物菌体、動物組織、植物組織の破碎液などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。当初から検体中に存在するグルコースはトレハロースの酵素的定量反応において妨害因子となり得るが、本発明における検体は、トレハロースの他にグルコースが含まれることが予想されるものであってもよいし、予想されないものであってもよい。

【0014】(a) グルコース消去前処理試薬(I)の使用検体中に  $\alpha$ -D-グルコースが存在する場合、その  $\alpha$ -D-グルコースはムタロターゼにより  $\beta$ -D-グルコースに変換される。変換された  $\beta$ -D-グルコース(検体中に  $\beta$ -D-グルコースが当初より存在する場合には、さらにその  $\beta$ -D-グルコース)は、グルコースオキシダーゼにより酸素および水と反応し、 $\beta$ -D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンと過酸化水素を生成する。ここで生成した過酸化水素もトレハロースの酵素的定量反応に影響を与えるため、カタラーゼにより水と酸素に変換される。このように、グルコース消去前処理試薬(I)を使用して前処理を行うことにより、被検液中に原始的に存在するグルコースは、トレハロースホスホリラーゼを用いたトレハロースの酵素的測定方法に関与しなくなるため、目的物質であるトレハロースを高感度に直接測定することができる。

【0015】(b) 生成グルコース検出試薬(II)の使用生成グルコース検出試薬(II)中のアジ化ナトリウムは、上記前処理で使用したカタラーゼの酵素活性を阻害する。カタラーゼは、グルコースの定量に利用される過酸化水素を分解してしまうため、その酵素活性を阻害することよりグルコースを正確に定量することができる。検体中のトレハロースは、まずトレハロースホスホリラーゼによってリン酸と反応し、 $\alpha$ -D-グルコースおよびグルコース-1-リン酸を生成する。次いで、生成した  $\alpha$ -D-グルコースは、ムタロターゼにより  $\beta$ -D-グルコースに変換される。この遊離、生成した  $\beta$ -D-グルコースはグルコースオキシダーゼにより酸素および水と反応し、 $\beta$ -D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンと過酸化水素を生成する。なお、この反応過程におけるムタロターゼおよびグルコースオキシダーゼは、グルコース消去前処理試薬(I)に含まれるものとそのまま利用することができるが、これには限定されない。

【0016】生成した過酸化水素は、ペルオキシダーゼにより、4-アミノアンチビリンおよび水素供与体と反応して発色するため、この発色した過酸化水素について、500~600 nm、望ましくは542 nm付近の吸光度を測定することにより、 $\beta$ -D-グルコース、ひいてはトレハロースを定量することができる。なお、最大吸収波長は542 nmであり、自動生化学分析機で設定可能な波長は546

## 5

nmである。本発明のトレハロース分析用試薬を用いたトレハロースの酵素的測定は、例えば以下のようにして行うことができる。

【0017】まず、被検液とグルコース消去前処理試薬(I)とを混合し、一定温度、例えば37°Cで、一定時間、例えば20分間又はそれ以上の時間インキュベートし、被検液中のグルコースを消去する。このようにして前処理を行った被検液と、生成グルコース検出試薬(II)とを混合し、一定温度、例えば37°Cで、一定時間、例えば5分間又はそれ以上の時間インキュベートし、発色反応の結果を542nm付近における吸光度により測定する。

【0018】この測定は、一般的に用手法またはオート法により行うことができる。用手法とは、測定者が、定められた時間毎に定められた量の試薬をピペット等を用いて入れ、一定時間後に測定する方法であり、オート法とは、一般に臨床検査に用いられる生化学自動分析機（オートアナライザー）を用いて測定する方法である。本発明のトレハロース分析用試薬によれば操作が簡便であり、自動分析（オート法）にも極めて適している。\*

## グルコース消去前処理試薬(R1)

リン酸緩衝液(pH 6.9)	200 mM
ムタクロターゼ	10単位/ml
グルコースオキシダーゼ	100単位/ml
カタラーゼ	2000単位/ml
ウシ血清アルブミン	0.02重量%

## 生成グルコース検出試薬(R2)

リン酸緩衝液(pH 6.9)	200 mM
アジ化ナトリウム	0.2重量%
エチレンジアミン四酢酸	2 mM
4-アミノアンチピリン	2 mM
N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン	2 mM
Tween 20	0.1重量%
ペルオキシダーゼ	10単位/ml
トレハロースホスホリラーゼ	0.055単位/ml
ウシ血清アルブミン	0.02重量%

【0022】被検液としては、3g/lのグルコースを含むトレハロース水溶液（トレハロース濃度：0g/l, 1g/l, 2g/l, 3g/l, 4g/l, 5g/l, 6g/l, 7g/l, 8g/l, 9g/l, 10g/l）を使用した。この被検液50μlに、50μlのR1を加え、37°Cで20分間インキュベートした後、500μlのR2を加え、37°Cで正確に20分間インキュベートした。この発色反応について、542 nmの吸光度を測定した。結果を図2のグラフに示す。図2に示されるように、本発明のトレハロース分析用試薬（用手法）によれば、1~10g/l（約2.6~26mM）の濃度のトレハロースの定量を行うことができる。

【0023】（実施例2）トレハロースの定量：オート法

トレハロースホスホリラーゼの濃度を0.11単位/mlとす

\* 【0019】以上説明した本発明のトレハロース分析用試薬によれば、被検液中のグルコースをあらかじめ消去した後、そのまま引き続いてトレハロースホスホリラーゼを用いたトレハロースの酵素的定量測定を行うことができるため、従来、検体プランクをとるために1検体で2回以上の測定を要したのに比べ、操作が簡単であり、しかも精度が高い。したがって、本発明のトレハロース分析用試薬は、特にトレハロース検出のスクリーニングに極めて適している。また、本発明の試薬は、トレハロース合成酵素生産微生物の検索用試薬としても使用することができる。

## 【0020】

【実施例】以下、実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

（実施例1）トレハロースの定量：用手法  
下記の組成を有する試薬を調製した。

## 【0021】

※る以外、実施例1同様の試薬を調製した。被検液としては、1g/lのグルコースを含むトレハロース水溶液（トレハロース濃度：0g/l, 1g/l, 2g/l, 3g/l, 4g/l, 5g/l, 6g/l, 7g/l, 8g/l, 9g/l, 10g/l）を使用した。この被検液20μlに、200μlのR1を加え、37°Cで5分間インキュベートした後、200μlのR2を加え、37°Cで5分間インキュベートした。この発色反応について、546 nmの吸光度を測定した。結果を図3のグラフに示す。図3に示されるように、本発明のトレハロース分析用試薬（オート法）によれば、1~10g/l（約2.6~26mM）の濃度のトレハロースの定量を行うことができる。

【0024】（実施例3）グルコースの影響の測定：用手法

被検液として、0g/l, 0.5g/l, 1g/l, 1.5g/l, 2g/l, 2.

5 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l のグルコースを含むトレハロース水溶液（トレハロース濃度：5 g/l）を使用する以外、実施例1と同様の測定を行った。結果を図4のグラフに示す。

【0025】図4に示されるように、本発明のトレハロース分析用試薬（用手法）によれば、被検液中にグルコースが存在する場合であっても、少なくとも5 g/l のグルコースを処理してその影響を消去することができ、トレハロースの定量を正確に行うことができる。

【0026】（実施例4）グルコースの影響の測定：オート法

被検液として、0 g/l, 0.5 g/l, 1 g/l, 1.5 g/l, 2 g/l, 5 g/l, 3 g/l のグルコースを含むトレハロース水溶液（トレハロース濃度：5 g/l）を使用する以外、実施例2と同様の測定を行った。結果を図5のグラフに示す。図4に示されるように、本発明のトレハロース分析用試薬（オート法）によれば、被検液中にグルコースが存在する場合であっても、グルコースの濃度が1 g/l 以下であれば、その影響を消去してトレハロースの定量を正確に行うことができる。

## 【0027】

【発明の効果】本発明のトレハロース分析用試薬によれば、被検液中に存在する、測定ブランクを大きくし、トレハロースの酵素的測定の妨げとなるグルコースによる影響を消去でき、ブランク測定を行うことなく、簡便にかつ正確にトレハロースの測定を行うことができる。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のトレハロース分析用試薬による反応過程を示す図である。(a) はグルコース消去前処理試薬(I)による反応過程を示すものであり、(b) は生成グルコース検出試薬(II)による反応過程を示すものである。

【図2】実施例1におけるトレハロースの定量結果（用手法）を示すグラフである。

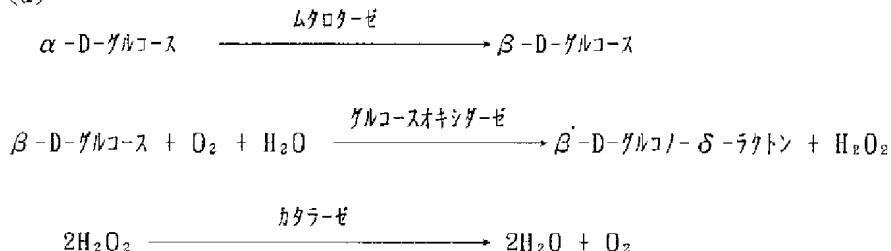
【図3】実施例2におけるトレハロースの定量結果（オート法）を示すグラフである。

【図4】実施例3における被検液中のグルコースの影響を測定した結果（用手法）を示すグラフである。

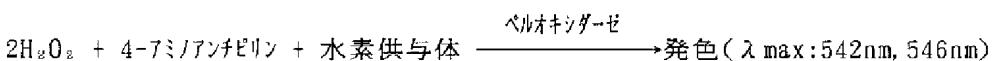
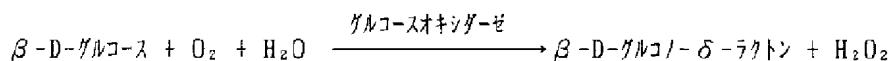
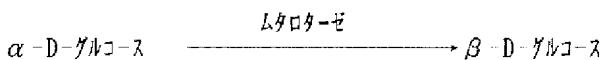
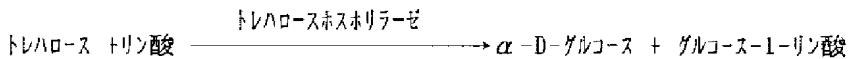
【図5】実施例4における被検液中のグルコースの影響を測定した結果（オート法）を示すグラフである。

【図1】

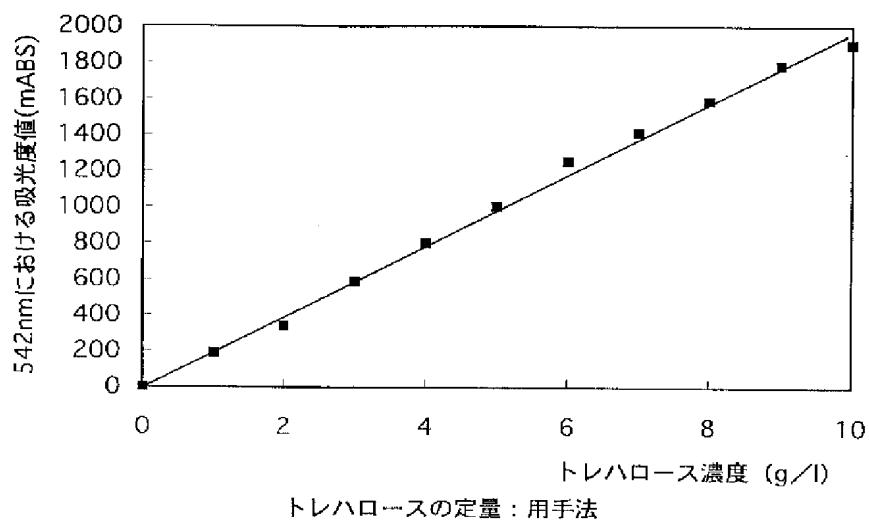
(a)



(b)

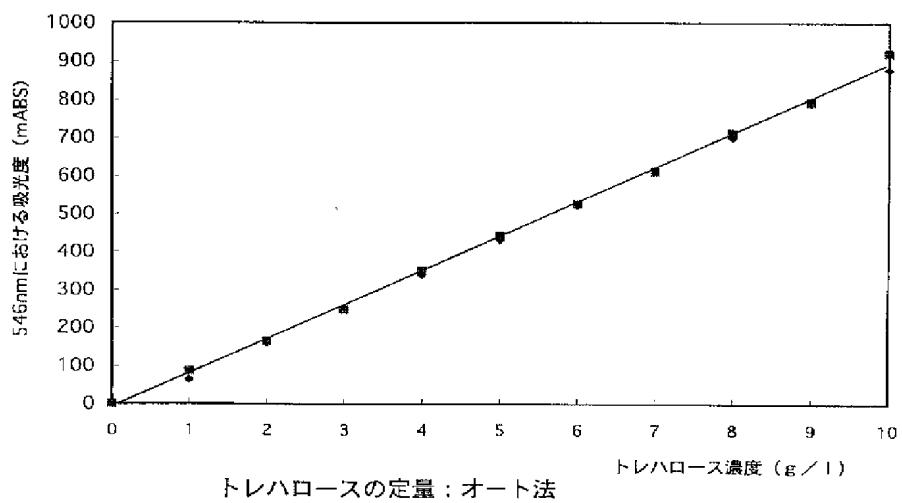
(カタラーゼ  $\longleftrightarrow$  アセチルナトリウムで阻害)

【図2】



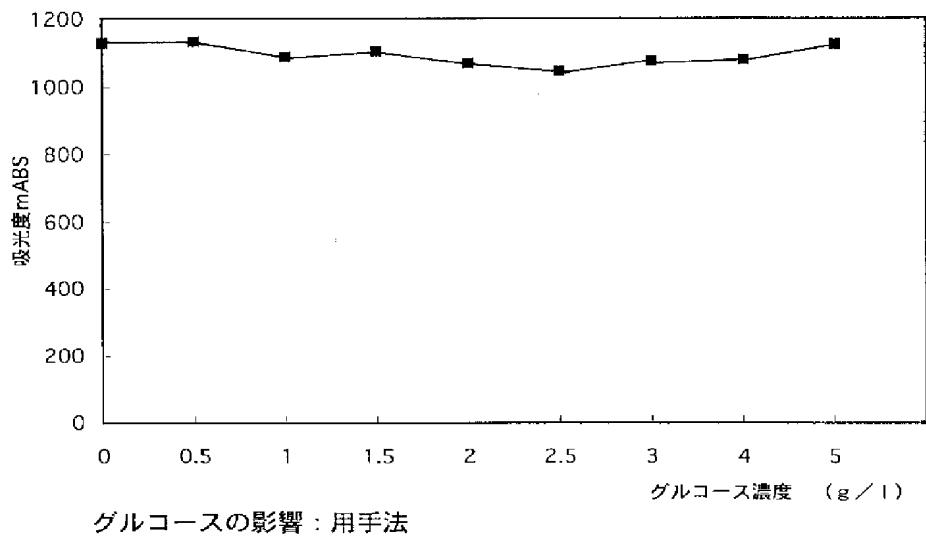
トレハロースの定量：用手法

【図3】



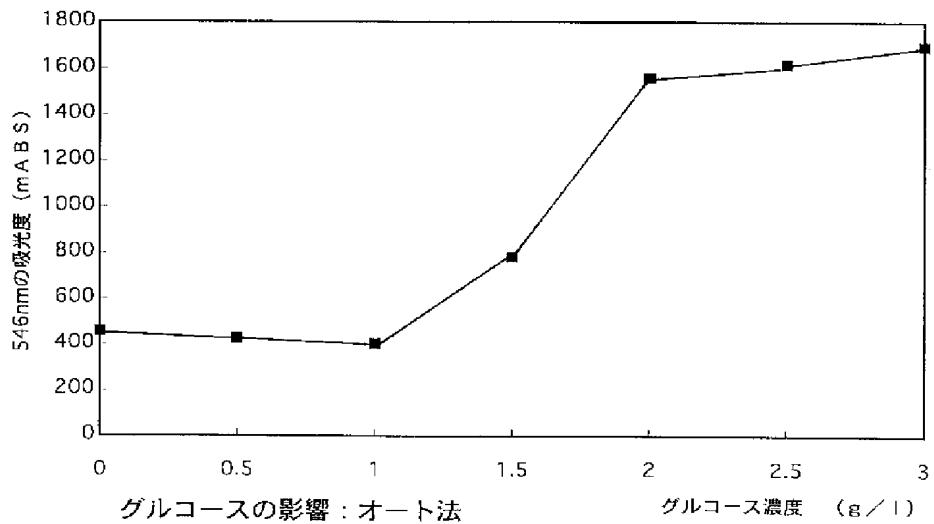
トレハロースの定量：オート法

【図4】



グルコースの影響：用手法

【図5】



フロントページの続き

(72)発明者 山岸 政昭  
静岡県焼津市西小川5丁目17番地-12  
(72)発明者 戸塚 好之  
静岡県静岡市下川原2丁目14-2  
(72)発明者 窪田 悟夫  
静岡県静岡市池田1004番地

(72)発明者 大口 真央  
静岡県静岡市登呂4丁目25番8号  
(72)発明者 和田 正  
静岡県静岡市聖一色25-1 ディアス川口  
B201  
(72)発明者 佐野 孝文  
静岡県庵原郡富士川町南松野1759-4